

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 47/48</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/32237 (43) Date de publication internationale: 8 juin 2000 (08.06.00)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02939 (22) Date de dépôt international: 26 novembre 1999 (26.11.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/15073 30 novembre 1998 (30.11.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SYNTHEM (S.A.) [FR/FR]; Parc Scientifique Georges Besse, F-30000 Nîmes (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TEMSAMANI, Jamal [FR/FR]; Résidence de l'Empereur, Bâtiment B, 26, chemin des Carrières, F-30900 Nîmes (FR). KACZOREK, Michel [FR/FR]; 81, boulevard de la Lironde, F-34980 Montferrier sur Lez (FR). COLIN DE VERDIERE, Annik [FR/FR]; 113, allée des Pins, Résidence Claude Monet, F-30000 Nîmes (FR). (74) Mandataires: BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING AN ANTI-CANCER AGENT AND AT LEAST A PEPTIDE (54) Titre: COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT UN AGENT ANTI-CANCEREUX ET AU MOINS UN PEPTIDE (57) Abstract The invention concerns a pharmaceutical composition for treating and/or preventing cancer comprising at least an anti-cancer agent, characterised in that said anti-cancer agent is associated in the composition with at least a peptide capable of carrying said agent into the cancer cells and prevent the occurrence of chemoresistance to said agent. (57) Abrégé - La présente invention concerne une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des cancers comprenant au moins un agent anti-cancéreux, caractérisée en ce que ledit agent anti-cancéreux est associé dans la composition avec au moins un peptide capable de transporter ledit agent dans les cellules cancéreuses et d'empêcher l'apparition d'une chimiorésistance vis-à-vis dudit agent.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT UN AGENT ANTI-CANCEREUX ET AU MOINS UN PEPTIDE

5

La présente invention concerne l'utilisation de peptides pour la vectorisation d'agents anticancéreux pour des applications dans le traitement et/ou la prévention des cancers et plus particulièrement dans le domaine de la chimiorésistance.

10

Un problème important auquel se heurte la pharmacologie des produits anticancéreux est la résistance intrinsèque ou acquise des cellules cancéreuses à ces produits. En effet, on observe que les cellules cancéreuses de nombreux patients atteints de cancer deviennent ou sont résistantes aux agents anticancéreux, ce qui se traduit par l'apparition de nouvelles évolutions tumorales chez le patient. Les épithéliomes digestifs, les mélanomes, les cancers du rein sont des exemples de chimiorésistance innée. Les leucémies, les cancers du sein, les cancers des bronches à petites cellules chez l'adulte, les neuroblastomes chez l'enfant, répondent généralement bien en début de traitement mais, dans une proportion importante, deviennent progressivement résistants aux traitements.

15

20

25

La résistance primaire peut-être liée à des mécanismes d'inhibition du transport transmembranaire, d'inhibition de l'activation des prodrogues, à la modification de l'enzyme cible, de voies métaboliques, à des phénomènes de réparation et d'inactivation.

30

Les phénomènes de résistance acquises sont multiples. L'une de ces résistances est la résistance multidrogue (multidrug resistance ou MDR). La MDR est associée à une diminution de la rétention intracellulaire des médicaments de mode d'action cependant différents (Chen et al., 1986, Cell 47, 381-389 ; Krishan et al., 1997, Cytometry 29, 279-285 ; Riordan et al., 1985, Nature 316, 817-819).

35

Une protéine associée à la membrane, la P-glycoprotéine ou "P-gp", est l'expression phénotypique du

gène MDR. Cette protéine agit comme une pompe énergie dépendante transportant des drogues cytotoxiques vers l'extérieur de la cellule avant qu'elles ne produisent leurs effets. L'expression de cette protéine conduit la cellule
5 tumorale à résister à des concentrations élevées d'agents cytotoxiques tels que la doxorubicine, la daunomycine, l'actinomycine D, la vinblastine, la vincristine, la mitomycine C, l'etoposide, la téniposide, etc.... La protéine P-gp est exprimée dans les cellules normales comme dans
10 celles du tractus gastro-intestinal, du foie ou du rein, où l'on pense qu'elle sert à éliminer les toxines ou des médicaments. Elle serait aussi responsable de la faible pénétration dans le cerveau de nombreux médicaments.

15 Une des priorités de la recherche dans le domaine du cancer, est donc de trouver des moyens efficaces pour circonvenir à l'expression et l'efficacité du phénotype de la résistance multidrogue, afin de limiter les échecs des chimiothérapies. Plusieurs études ont été réalisés pour
20 trouver des agents qui inhibent la résistance liée à la P-gp et à restaurer totalement ou partiellement, l'activité antitumorale du produit cytotoxique. De tels agents sont appelés chimiosensibilisateurs ou modulateurs de la P-gp. Ces agents agissent soit directement, en interférant, par
25 compétition ou encombrement stérique, au niveau des sites de fixation des agents cytotoxiques ou indirectement en inhibant la protéine responsable par divers mécanismes. Toute une série de produits sont capables d'inhiber la
résistance multi-drogues, tels que des inhibiteurs des
30 canaux calciques, phénothiazines, quinidine, agents anti-paludéens, anti-oestrogène, cyclosporine. Cependant la toxicité de ces produits limite pour l'instant leur utilisation clinique.

35 Afin de palier cet inconvénient, il a été proposé dans l'art antérieur des systèmes de transport de certains agents anticancéreux, notamment la doxorubicine, utilisant la transferrine (Barabas K. et al., 1992, The Journal of Biological Chemistry, 267(13) : 9347-9442), le

5 dextran (Ueda Y. et al., 1989, Chem. Pharm. Bull., 37(6) : 1639-41 ; Sheldon K. et al., 1989, Anticancer Research, 9(3) : 637-642), des anticorps (Hurwitz E. et al., 1975, Cancer Research, 35 : 1175-1181), des microspheres (Rogers K. E. et al., 1983, Cancer Research, 43 : 2741-2748 ; Jeanneson P. et al., 1990, Cancer Research, 50, 1231-1236), des polymères (Tokoyama M. et al., 1990, Cancer Research, 50 : 1693-1700), ou des fragments de protéines (Ohkawa K. et al., 1993, British Journal of Cancer, 67 : 247-8 ; Asakura T. et al., 10 1997, Anticancer Drug, 8(2) : 199-203). Il a aussi été proposé des moyens de transport des agents anti-cancéreux par séquestration dans des liposomes ou des nanoparticules (Kruh G. D. et Goldstein L. J., 1993, Curr. Opin. Oncol., 5(6) : 1029-34 ; Cuvier C. et al., 1992, Biochemical 15 Pharmacology, 44 : 509-517). Mais ces systèmes ne se sont pas avérés performants du fait notamment de leur toxicité, d'une faible spécificité vis-à-vis des cellules cancéreuses, de la mauvaise stabilité du produit fini au cours de la conservation, et d'une faisabilité difficile.

20 La présente invention vise donc à offrir un nouveau moyen efficace et non toxique pour lutter contre le problème de résistance multidrogue. Ce but est atteint grâce à l'utilisation de peptides pour la vectorisation d'agents 25 cytotoxiques jusqu'à la cible cancéreuse, lesdits peptides permettant en outre de faire échapper lesdits agents aux différents mécanismes de résistance et particulièrement à la pompe P-gp.

30 Il a été décrit dans l'art antérieur de nombreux peptides capables de traverser les membranes des eucaryotes de manière très rapide et tels que les peptides suivants : Protégrine, Antennapedia, Tachyplésine, Transportan, etc....

35 Parmi ceux-ci, certains présentent des propriétés cytolytiques. Ces peptides dénommés peptides antibiotiques sont notamment les Protégrines et Tachyplésines. Les Protégrines et Tachyplésine sont des peptides antibiotiques naturels dont la structure est de type épingle à cheveux maintenue par des ponts disulfures.

Ces ponts jouent un rôle important dans l'activité cytolytique observée sur cellules humaines.

Selon leur structure, les peptides antibiotiques peuvent être classés en trois grandes familles :

5 - Les peptides antibiotiques à hélices alpha amphipatiques : cécropines et maganines (Maloy, W. L. et al., 1995, BioPolymer 37, 105-122).

10 - Les peptides antibiotiques à feuillet bêta réunis par des ponts disulfures : défensines (Lehrer, R. I. et al., 1991, Cell 64:229-230 ; Lehrer, R. I. et al., 1993, Ann. Rev. Immunol. 11:105-128), protégrines (Kokryakov, V. N. et al., 1993, FEBS 337:231-236), tachyplésines (Nakamura, T. et al., 1988, J. Biol. Chem. 263:16709-16713 ; Miyata, T et al., 1989, J. Biochem. 106:663-668).

15 - les peptides antibiotiques à chaînes déstructurées contenant de nombreux coudes liés à la présence de multiples prolines : bacténécines et PR39 (Frank, R. W. et al., 1991, Eur. J. Biochem. 202, 849-854).

20 On désigne sous le nom de protégrines un ensemble de cinq peptides désignés PG-1, PG-2, PG-3, PG-4 et PG-5 dont les séquences sont données ci-dessous, étroitement apparentés et isolés de leucocytes de porc (V.N. Kokryakov & col. FEBS lett. 327, 231-236) :

25 PG-1 : RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH₂

PG-2 : RGGRLCYCRRRFCICV..-NH₂

PG-3 : RGGGLCYCRRRFCVCVGR-NH₂

PG-4 : RGGRLCYCRGWICFCVGR-NH₂

PG-5 : RGGRLCYCRPRFCVCVGR-NH₂

30 Les tachyplésines (Tamura, H. et al., 1993, Chem. Pharm. Bul. Tokyo 41, 978-980), désignées T1, T2 et T3 et les polyphémusines (Muta, T., 1994, CIBA Found. Sym. 186, 160-174), désignées P1 et P2, dont les séquences sont données ci-dessous, sont des peptides homologues isolés de l'hémolymphe de deux crabes, *Tachypleus tridentatus* pour
35 les tachyplésines T1, T2 et T3 et *Limulus polyphemus* pour les polyphémusines P1 et P2 :

P1 : RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH₂

P2 : RRWCFRVCYKGFYRKCR-NH₂

Protégrines, tachyplésines et polyphémusines contiennent une forte proportion de résidus basiques (lysines et arginines) et possèdent quatre cystéines qui forment deux ponts disulfures parallèles. Ces trois familles de peptides présentent également des homologies avec certaines défensines et en particulier avec la défensine humaine NP-1 (Kokryakov, V. N. et al., 1993, Febs Let. 327, 231-236).

Ainsi, dans le cadre de ces travaux de recherche, la Demanderesse a découvert que la réduction irréversible de ces ponts disulfures permet d'obtenir des peptides linéaires, ayant la capacité de traverser rapidement les membranes des cellules de mammifères par un mécanisme passif ne faisant pas appel à un récepteur membranaire. Ces peptides linéaires sont non-toxiques et sans activité lytique, et en conséquence, ils constituent un nouveau système de vectorisation de substances actives dans les domaines thérapeutique ou diagnostic. Les travaux et résultats concernant ces peptides linéaires et leur utilisation comme vecteurs de substances actives sont décrits dans la demande de brevet français de la Demanderesse déposée le 12 Août 1998 sous le No. 97/10297 dont l'enseignement est incorporé ici par référence.

Les peptides issus de la famille Antennapedia sont des dérivés du facteur de transcription de l'homéodomaine Antennapedia de la mouche drosophile et sont par exemple décrits dans les demandes de brevet internationales PCT publiées sous les No. WO91/18981 et WO97/12912. La séquence de ces peptides présente la particularité d'être hautement conservée dans toutes les homéoprotéines. Ces peptides sont composés de trois hélices alpha et sont capables de se transloquer au travers de la membrane cellulaire. Le plus petit fragment de l'homéodomaine capable de traverser les membranes est un peptide de 16 acides aminés (Prochiantz, 1996, Curr. Opin. In Neurob. 6, 629-634 ; Derossi et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 10444-10450).

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont maintenant permis à la demanderesse de montrer que ces peptides linéaires, c'est à dire dépourvus de pont disulfure, peuvent être utilisés
 5 comme système de vectorisation très efficace permettant de d'amener une substance anti-cancéreuse jusqu'à une cible et de faire traverser à ladite substance la membrane cellulaire de façon à conduire celle-ci jusque dans un compartiment cellulaire tel que le cytoplasme ou le noyau.
 10 En outre, de façon surprenante, la Demanderesse a découvert, qu'en plus de leur capacité de vectorisation, certains des ces peptides peuvent être utilisés pour empêcher l'expression de résistance intrinsèque ou acquise des cellules cancéreuses vis-à-vis de ces agents, ci-après aussi
 15 désigné chimiorésistance, notamment de contrer le phénomène de résistance multidrogue (MDR) et de permettre à ces agents d'échapper à la pompe P-gp.

L'invention a donc plus particulièrement pour
 20 objet une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des cancers comprenant au moins un agent anti-cancéreux, caractérisée en ce que ledit agent anti-cancéreux est associé dans la composition avec au moins
 25 peptide linéaire capable de transporter ledit agent dans les cellules cancéreuses et d'empêcher l'apparition d'une chimiorésistance vis-à-vis dudit agent, ledit peptide répondant à l'une des formules (I), (II) ou (III) suivantes:

$$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16} \text{ (I)}$$

 dans laquelle formule (I), les résidus X_1 à X_{16}
 30 sont des résidus d'acides aminés dont 6 à 10 d'entre-eux sont des acides aminés hydrophobes et X_6 est le tryptophane,

$$BXXBXXXXBBBXXXXXXB \text{ (II)}$$

$$BXXXBXXXBXXXBBXB \text{ (III)},$$

 dans lesquelles formules (II) et (III) :
 35 - les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

- les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou aromatique,

5 ou lesdits peptides de formules (I), (II), (III) sous forme rétro, constitués d'acides aminés de configuration D et/ou L, ou un fragment de ceux-ci constitué d'une séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs des peptides de formules (I), (II) ou (III), dès lors bien entendu que ce fragment
10 présente les propriétés de vectorisation sans toxicité pour les cellules.

Les peptides de formule (I) dérivent de la famille Antennapedia. Dans les peptides de formules (I), les
15 acides aminés hydrophobes sont l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, le tryptophane, la tyrosine et la méthionine, et les autres acides aminés sont des acides aminés :

- non-hydrophobes qui peuvent être des acides aminés non polaires comme la glycine, ou polaires comme la
20 sérine, la thréonine, la cystéine, l'asparagine, la glutamine, ou

- acides (acide aspartique ou glutamique), ou
- basiques (lysine, arginine ou histidine), ou
25 - une association d'acides aminés de ces trois catégories.

- Parmi les peptides de formule (I), on préfère ceux comprenant 6 acides aminés hydrophobes et 10 acides aminés non-hydrophobes.
30

Les peptides linéaires de formule (II) dérivent de la famille Protégrine et les peptides linéaires de formule (III) dérivent de la famille Tachyplésine. Parmi les peptides de formules (II) et (III), on préfère ceux dans
35 lesquels :

- B est choisi parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine, et

- X est choisi parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{AcM}, la penicillamine, la méthionine, le serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la bêta-cyclohexyalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la bêta-homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtyalanine, la 2-naphtyalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridyalanine, la [2-thiényl]alanine.

Dans les peptides de formules (I), (II) ou (III), B, X et X₁ à X₁₆ peuvent être des acides aminés naturels ou non, y compris des acides aminés de configuration D.

Des peptides préférés utilisés selon l'invention sont choisis parmi ceux dont les séquences en acides aminés sont les suivantes :

RGGRLSYSRRRFSTSTGR
RGGRLSYSRRRFSVSVGR
KWSFRVSYRGISYRRSR
RRLSYSRRRF
Rqikiwfgnrrmkwkk
CENIKIWLSLRSYLKRR
RGGRLAYLRRRWAVLVGR

où les lettres minuscules représentent des acides aminés sous forme D.

L'association d'un agent anti-cancéreux et d'un peptide défini ci-dessus dans les compositions de l'invention consiste avantageusement en un couplage qui peut être réalisé par tout moyen de liaison acceptable compte tenu de la nature chimique, de l'encombrement et du nombre d'agent anti-cancéreux et de peptide associés. Il peut

s'agir de liaisons covalentes, hydrophobes ou ioniques, clivables ou non-clivables dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur de la cellules.

5 Le couplage peut être effectué en n'importe quel site du peptide, dans lequel des groupements fonctionnels tels que -OH, -SH, -COOH, -NH₂ sont naturellement présents ou ont été introduits. Ainsi, un agent anti-cancéreux peut être lié au peptide au niveau des extrémités N-terminale ou C-terminale ou bien au niveau des chaînes latérales du peptide.

10 De même, le couplage peut être effectué en n'importe quel site de l'agent actif, où par exemple des groupements fonctionnels tels que -OH, -SH, -COOH, -NH₂ sont naturellement présents ou ont été introduits.

15 Ainsi, l'invention se rapporte à l'utilisation de composés répondant à la formule (IV) suivante :

A (-)_m (B)_n (IV)

dans laquelle

20 - A représente un peptide tel que défini précédemment,

- B représente un agent anti-cancéreux,

- n est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10 avantageusement jusqu'à 5,

25 - (-)_m représente la liaison, ou linker, entre A et B, où m est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10 avantageusement jusqu'à 5,

30 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention des cancers sans induire de chimiorésistance.

Les composés de formule (IV) peuvent être préparés par synthèse chimique ou en utilisant des techniques de biologie moléculaire.

35 On peut utiliser pour les synthèses chimiques des appareils commerciaux permettant d'incorporer des acides aminés non-naturels, tels que les énantiomères D et des résidus ayant des chaînes latérales ayant des hydrophobicités et des encombrements différents de ceux de leurs homologues naturels. Au cours de la synthèse, il est

évidemment possible de réaliser un large éventail de modifications, par exemple introduire sur le N-terminal un lipide, par exemple prenyl ou myristyl, de façon à pouvoir ancrer le peptide de l'invention et donc le composé de formule (IV) à une membrane lipidique telle que celle d'un liposome constitué de lipides. Il est également possible de remplacer une ou plusieurs liaisons peptidiques (-CO-NH-) par des structures équivalentes comme -CO-N(CH₃)-, -CH₂-CH₂-, -CO-CH₂-, ou bien d'intercaler des groupes comme -CH₂-, -NH-, -O-.

On peut également obtenir les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique à partir d'une séquence d'acide nucléique codant pour celui-ci. La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour un peptide linéaire dérivé de peptide antibiotique. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour un composé de formule (IV) ou une partie de celui de nature protéique. Ces séquences d'acides nucléiques peuvent être des ADN ou ARN et être associées à des séquences de contrôle et/ou être insérées dans des vecteurs. Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agir de tout vecteur comme un plasmide. Ces acides nucléiques et vecteurs sont utiles pour produire les peptides et les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique dans un hôte cellulaire. La préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des peptides ou des composés de formule (IV) peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

Comme indiqué précédemment, les travaux de recherche ont mis en évidence que de manière surprenante, les peptides définis ci-dessus, sont capables non seulement de transporter l'agent anticancéreux jusque dans les cellules cancéreuses, mais aussi d'empêcher l'apparition de chimiorésistance vis-à-vis de cet agent. En conséquence,

l'invention a également pour objet un procédé d'inhibition de la capacité éventuelle d'un agent anticancéreux à induire une chimiorésistance chez un sujet ayant reçu ledit agent consistant à associer ledit agent à au moins un peptide de formules (I), (II) ou (III) par tout moyen approprié comme notamment ceux décrits précédemment.

L'invention a donc également pour objet l'utilisation d'un composé de formule (IV) tel que défini précédemment pour la préparation d'un médicament anticancéreux capable en outre de prévenir l'apparition d'une chimiorésistance.

Selon une forme préférée de mise en œuvre de l'utilisation ci-dessus, ledit peptide est associé dans le médicament avec l'agent anti-cancéreux par une liaison du type de celle décrite précédemment. Tout préférentiellement cette liaison est clivable sélectivement dans le milieu cellulaire. Ledit médicament comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable et compatible avec le mode d'administration adopté.

Les agents anti-cancéreux entrant dans le cadre de la présente invention sont tous ceux utilisés ou utilisables en chimiothérapie, comme par exemple de manière non limitative : la doxorubicine, la daunomycine, l'actinomycine D, la vinblastine, la vincristine, la mitomycine C, L'etoposide, le téniposide, le taxol, le taxotère, le méthotrexate, etc... Bien entendu, l'invention concerne plus particulièrement les agents anti-cancéreux dont ont déjà mis en évidence l'apparition d'une chimiorésistance chez les individus qui y ont été exposés.

On entend aussi par agent anti-cancéreux, dans le cadre de la présente invention, des substances actives contre la P-gp ou le gène codant celle-ci, et plus particulièrement des anticorps ou partie d'anticorps, des acides nucléiques et oligonucléotides ou des ribozymes. En effet, la présente invention concerne également l'association d'oligonucléotide antisens avec les peptides précédemment décrits pour bloquer l'expression de la P-gp et

donc utile dans le traitement ou la prévention des cancers en s'opposant au phénomène de résistance multidroque.

5 Les compositions de l'invention contenant des composés de formule (IV) et avantageusement un véhicule pharmaceutiquement acceptable peuvent être administrées par différentes voies comme par exemple de manière non limitative, les voies intraveineuse, intramusculaire, sous cutanée, etc....

10

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent concernant la préparation de composés de formule (IV) où l'agent anticancéreux est la doxorubicine et l'effet de la vectorisation de la doxorubicine sur son internalisation.

15

I - CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

1) Synthèse Chimique.

20

Plusieurs peptides ont été synthétisés et leur internalisation a été testée dans plusieurs lignées cellulaires. De façon générale, les propriétés physico-chimiques des peptides ont été modifiées, et les résultats obtenus montrent que suivant la modification, certains peptides pénètrent beaucoup mieux que d'autres, comme les peptides des composés No. 1 à 6 du tableau I ci-après. Il a également été observé que certains peptides pénètrent plus rapidement dans un type cellulaire que dans d'autres, ce qui indique un tropisme cellulaire.

25

30

a) Préparation de Doxorubicine-Succ-Peptides.

Comme indiqué dans le schéma de synthèse de la figure 1, le couplage de doxorubicine sur un peptide par l'intermédiaire du maillon succinique est effectué en 3 étapes :

35

Au chlorhydrate de doxorubicine (1 eq), solubilisé dans diméthylformamide (DMF) en présence de Diisopropyléthylamine (DIEA, 2 eq), est ajouté l'anhydride succinique (1,1eq, dissous dans DMF).

5 Après une incubation de 20 min à température ambiante, l'hémisuccinate de doxorubicine ainsi formé est ensuite activé par addition de PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxopyrrolidinephosphonium Hexafluorophosphate 1,1eq dans DMF) et DIEA (2 eq). Ce second mélange réactionnel est incubé 20 min.

10 Le peptide (1.2 eq dans DMF) est ensuite ajouté au mélange réactionnel, et se couple spontanément sur l'hémisuccinate de doxorubicine activé au cours d'une incubation supplémentaire de 20 min.

 Le produit de couplage est ensuite purifié sur HPLC (Chromatographie liquide haute pression) préparative, puis lyophilisé.

15 Chacune des étapes, ainsi que le produit final sont contrôlés par HPLC analytique et spectrométrie de masse.

 b) Préparation de Doxorubicine-SMP-3MP-Peptide.

20 Comme indiqué dans le schéma de synthèse de la figure 2, le couplage de la doxorubicine sur un peptide porteur de fonction thiol est effectué en 2 étapes :

25 Au chlorhydrate de doxorubicine (1 eq), solubilisé dans diméthylformamide (DMF) en présence de Diisopropyléthylamine (DIEA, 2 eq), est ajouté le N-hydroxy-Succinimidyl-Maleimido-Propionate (SMP, 1 eq dans dissous dans DMF).

30 Le peptide porteur d'une fonction thiol (1.2 eq dans DMF) est ensuite ajouté au mélange réactionnel, et se couple spontanément sur le maléimidopropionate de doxorubicine au cours d'une incubation supplémentaire de 20 min.

 Le produit de couplage est ensuite purifié sur HPLC (Chromatographie liquide haute pression) préparative, puis lyophilisé.

35 Chacune des étapes, ainsi que le produit final sont contrôlés par HPLC analytique et spectrométrie de masse.

2) Les produits testés.

Les produits testés sont rapportés dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I

Composé	
1	doxo-CO-(CH ₂) ₂ -CO- RGGRLSYSRRRFSTSTGR
2	doxo-CO-(CH ₂) ₂ -CO- RGGRLSYSRRRFSVSVGR
3	doxo-CO-(CH ₂) ₂ -CO- KWSFRVSYRGISYRRSR
4	doxo-CO-(CH ₂) ₂ -CO- RRLSYSRRRF
5	doxo-SMP-3MP-rqikiwfgnrrmkwkk
6	doxo-SMP-CENIKIWLSLRSYLKRR
7	doxo-CO-(CH ₂) ₂ -CO-RGGRLAYLRRRWAVLVGR

doxo = doxorubicine

CO-(CH₂)₂-CO = Linker succinate

SMP-3MP = Linker SuccinimydylMaleimido-Propionate-3-MercaptoPropionate.

3) Culture Cellulaire.

Les cellules de leucémie myéloïde chronique K562 sensibles et les cellules résistantes K562/ADR ainsi que les cellules HL60/R10 de leucémie promyéloïde sont d'origine humaine et ont été obtenues commercialement auprès de l'ATCC. Les cellules sontensemencées à environ 10⁴ cellules par puits, 24 h avant l'addition des produits. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère à 95% d'humidité et 5% de CO₂ dans un milieu OptiMem.

4) Internalisation.

Les cellules K562 sensibles et les cellules résistantes K562/ADR sont incubées soit avec la doxorubicine libre soit avec la doxorubicine vectorisée à une concentration de 3 µM. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées trois fois au PBS. L'internalisation des produits est ensuite analysée par cytométrie en flux. Les échantillons sont analysés par un cytomètre de flux équipé d'un laser argon de 15 mA. La

fluorescence émise est enregistrée sur une échelle logarithmique à (575 NM) nm après une excitation à (488) nm. La fluorescence est mesurée sur 10000 cellules sélectionnées suivant les paramètres de taille (SS) et de granulosité (FS). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives du logarithme de l'intensité de fluorescence. Les résultats sont analysés par le logiciel Cell Quest.

5) Cytotoxicité.

Les cellules K562 sensibles et les cellules résistantes K562/ADR sont incubées soit avec la doxorubicine libre soit avec la doxorubicine vectorisée à des concentrations croissantes. Après 48 heures en culture en présence des produits. A la fin du temps de culture, le MTT (3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure) est rajouté dans les puits et les plaques de culture sont ensuite incubées pendant 4 heures dans l'étuve. Le dépôt cristallin de formazan résultant est alors dissout par addition de 200 µl de DMF/SDS. La densité optique (DO) est mesurée à 550 nm (référence 630 nm) en utilisant un lecteur de microplaques.

La représentation graphique des pourcentages de DO des puits traités en fonction de la concentration de produits permet de déterminer la IC₅₀. Celle-ci correspond à la concentration du produit inhibant 50% de la croissance.

Les valeurs de la IC₅₀ permettent de quantifier le facteur de résistance (F. Rés) des lignées résistantes par le rapport suivant :

$$F.Rés = \frac{IC_{50} \text{ du cytotoxique de la lignée résistante}}{IC_{50} \text{ du cytotoxique de la lignée parentale sensible}}$$

Le facteur de réversion (F.Rev) correspond à l'effet d'un modulateur (le vecteur) sur la sensibilité des cellules aux agents antitumoraux selon le rapport suivant :

$$F.Rés = \frac{IC_{50} \text{ du cytotoxique seul}}{IC_{50} \text{ du cytotoxique vectorisé}}$$

5 II - RESULTATS.

1) Internalisation.

Les cellules sensibles K562 et résistantes K562/ADR sont incubées soit avec la doxorubicine libre soit
10 avec la doxorubicine vectorisée. Après 30 min d'incubation, l'internalisation des produits est mesurée par cytométrie de flux. La Figure 3 en annexe montre que dans les cellules résistantes K562/ADR, seulement 5,86% des cellules sont positive alors que quand elle est vectorisée (par exemple
15 sous la forme du composé No. 5 du tableau I) 98% des cellules sont positives, ce qui indique une nette amélioration de pénétration.

20 2) Cytotoxicité.

La sensibilité des cellules aux agents antitumoraux a été mesuré par le test MTT dans les conditions expérimentales définies ci dessus pour lesquelles la relation entre la densité optique et le nombre de
25 cellules viables est linéaire.

L'activité de la doxorubicine dans les cellules sensibles (K562) et dans les cellules résistantes (K562/ADR) a tout d'abord été observée. Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de doxorubicine et après
30 24 heures d'incubation, la survie des cellules est mesurée par le test MTT. Comme le montre la Figure 4, les cellules K562/ADR sont bien résistantes à la doxorubicine. Par exemple, à une concentration de 8 μ M, seulement 15% des cellules sensibles survivent alors que les cellules
35 résistantes survivent à 100%.

Puis, le cytotoxicité de la doxorubicine vectorisée a été analysée. Le tableau II ci-dessous représente les concentrations en produits entraînant 50%

d'inhibition de croissance (IC_{50}) déterminées sur la lignée sensible (K562) et la lignée résistante (K562/ADR).

Tableau II

Lignées	K562	K562/ADR	F.Rés	F.Rev
Doxo libre	0,9 μ M	25 μ M	28	
Composé 1	15 μ M	5-10 μ M	0,7	2,5
Doxo libre	0,15 μ M	15,5 μ M	100	
Composé 2	3,6 μ M	3,2 μ M	0,9	5
Doxo libre	0,45 μ M	65 μ M	144	
Composé 3	2 μ M	1,5 μ M	0,8	43
Doxo libre	ND	55 μ M		
Composé 4	20 μ M	20 μ M	1	2,8
Doxo libre	0,4 μ M	70 μ M	175	
Composé 5	1,5 μ M	2 μ M	1,3	35
Doxo libre	0,3 μ M	70 μ M	233	
Composé 6	5 μ M	5,5 μ M	1,1	12,8
Doxo libre	0,1 μ M	> 78 μ M	> 780	
Composé 7	3,5 μ M	3 μ M	0,85	> 26

5

Ces résultats montrent que les cellules K562/ADR sont bien résistantes à la doxorubicine seule. La vectorisation de la doxorubicine par un peptide-vecteur permet de circonvenir au problème de résistance multidrogue. Par exemple, dans un cas, la IC_{50} de la doxorubicine libre dans les cellules résistantes est de 70 μ M alors que quand elle est vectorisée (composé 5) la IC_{50} n'est que de 2 μ M.

Ces résultats montrent également que les produits vectorisés ne sont pas excrétés par la pompe P-gp puisque la même IC_{50} est obtenue dans les cellules sensibles et les cellules résistantes et le Facteur de résistance est presque 1.

Pour être sûr que la cytotoxicité observée pour la doxorubicine vectorisée ne provient pas du peptide tout seul, une expérience a été réalisée en comparant l'activité de la doxorubicine vectorisée (composé 2) avec la

10
15
20

doxorubicine rajoutée au peptide mais non couplée. La figure 5 en annexe montre que l'IC₅₀ de la doxorubicine vectorisée (composé 2) est de 19 µM alors que celle de la doxorubicine rajoutée au vecteur est d'environ 50 µM, démontrant ainsi la nécessité de vectorisation pour réduire la résistance des cellules.

Le même type d'expérience a été réalisée dans une autre lignée cellulaire résistante à la doxorubicine (HL60/R10). Les résultats de cytotoxicité dans les cellules HL60 avec le composé No. 2 sont rapportés dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III

	HL60/R10	F. Rev
Doxo libre	40 µm	
Composé No. 2	25 µm	1,6

REVENDEICATIONS

- 1) Composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des cancers comprenant 'au moins un agent anti-cancéreux, caractérisée en ce que ledit agent anti-cancéreux est associé dans la composition avec au moins peptide capable de transporter ledit agent dans les cellules cancéreuses et d'empêcher l'apparition d'une chimiorésistance vis-à-vis dudit agent, ledit peptide répondant à l'une des formules (I), (II) ou (III) suivantes:
- $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}$ (I)
- dans laquelle formule (I), les résidus X_1 à X_{16} sont des résidus d'acides aminés dont 6 à 10 d'entre-eux sont des acides aminés hydrophobes et X_6 est le tryptophane,
- $BXXBXXXXBBBXXXXXXB$ (II)
- $BXXXBXXXBXXXXBBXB$ (III),
- dans lesquelles formules (II) et (III) :
- les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidus d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et
 - les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidus d'acide aminé aliphatique ou aromatique,
- ou lesdits peptides de formules (I), (II), (III) sous forme rétro, constitués d'acides aminés de configuration D et/ou L, ou un fragment de ceux-ci constitué d'une séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs des peptides de formules (I), (II) ou (III).
- 2) Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que dans le peptide de formule (I), les acides aminés hydrophobes sont l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, le tryptophane, la tyrosine et la méthionine, et les autres acides aminés sont des acides aminés :
- non-hydrophobes qui peuvent être des acides aminés non polaires comme la glycine, ou polaires comme la

sérine, la thréonine, la cystéine, l'asparagine, la glutamine, ou

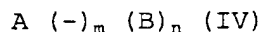
- acides (acide aspartique ou glutamique), ou
- basiques (lysine, arginine ou histidine), ou
- 5 - une association d'acides aminés de ces trois catégories.

3) Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le peptide de formule (I) comprend 6 acides aminés hydrophobes et 10 acides aminés non-hydrophobes.

4) Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que dans les peptides de formule (II) ou (III) :

- B est choisi parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine, et
- X est choisi parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{Ac_m}, la penicillamine, la méthionine, le serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la bêta-cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la bêta-homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

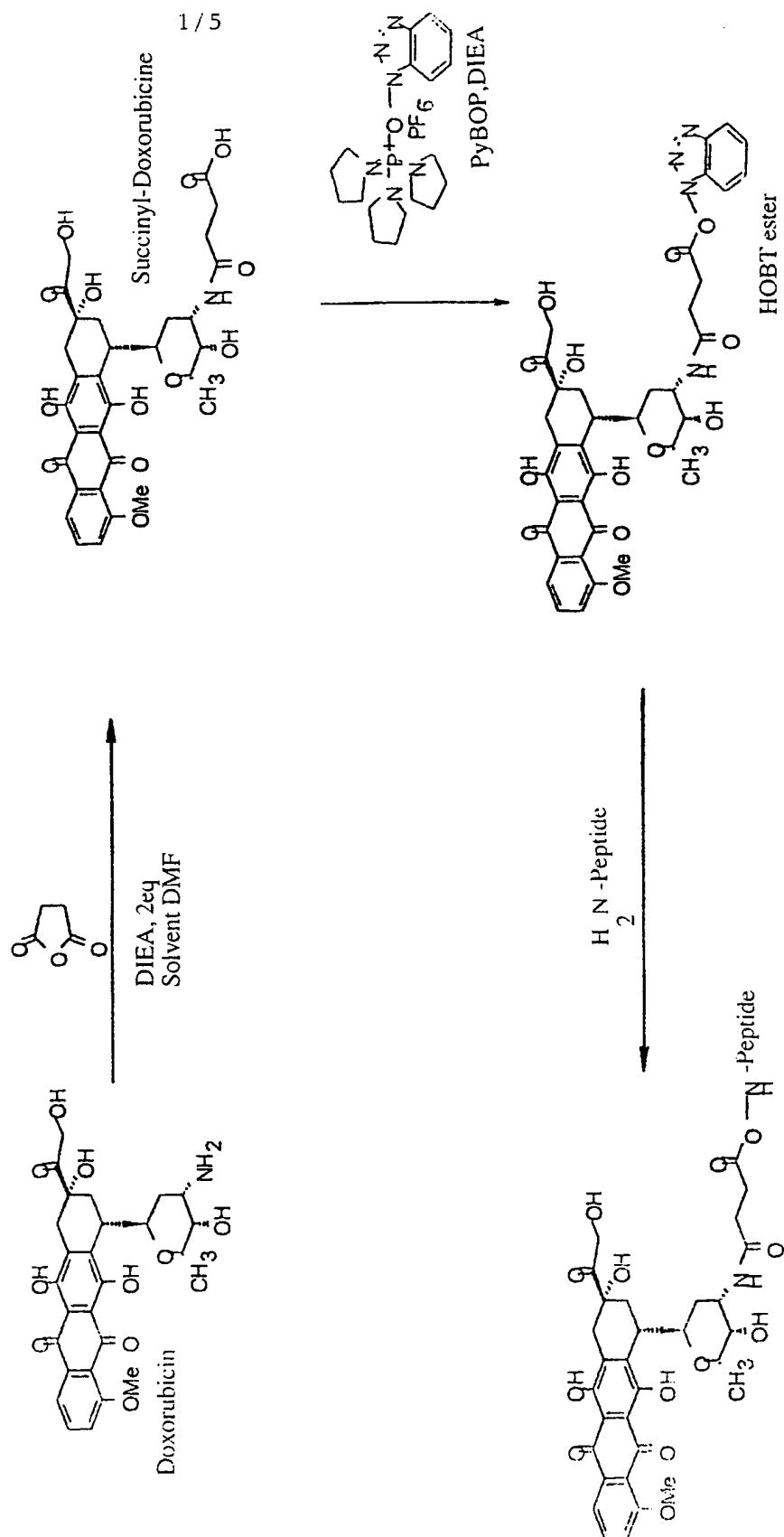
5) Utilisation d'un composé répondant à la formule (IV) suivante :



dans laquelle :

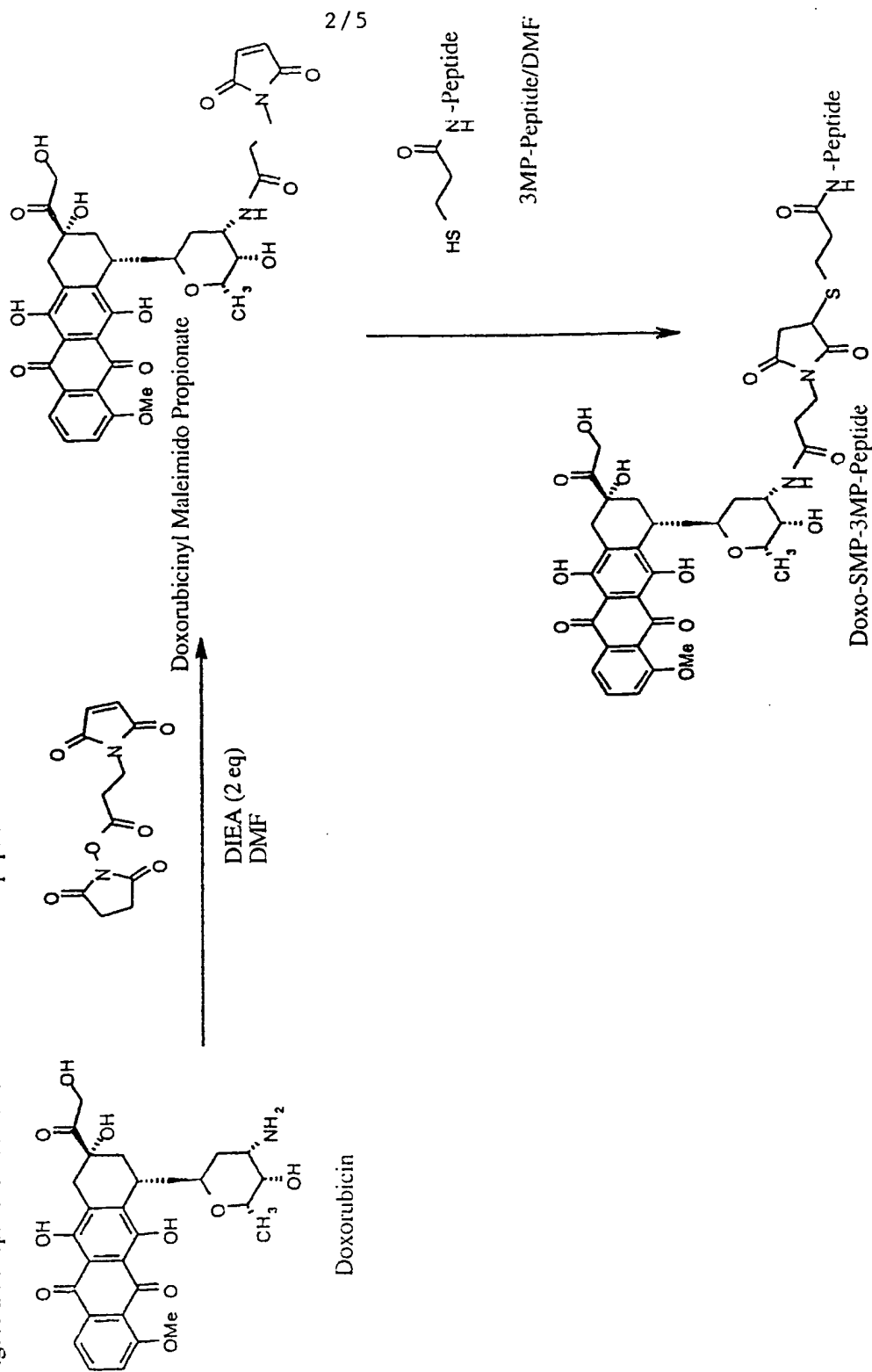
- A représente un peptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 4,
 - B représente un agent anti-cancéreux,
 - n est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10
- 5 avantageusement jusqu'à 5,
- $(-)_m$ représente la liaison, entre A et B, où m est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10 avantageusement jusqu'à 5,
- 10 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention des cancers et n'induisant pas de chimiorésistance.
- 15 6) Utilisation selon la revendication 5. caractérisée en ce que dans la formule (IV) la liaison $(-)_m$ entre A et B est une liaison covalente, hydrophobe ou ionique, clivable ou non-clivable dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur de la cellules, ou mélange de celles-ci.

Figure 1 : Préparation de doxorubicine-Succ-peptides



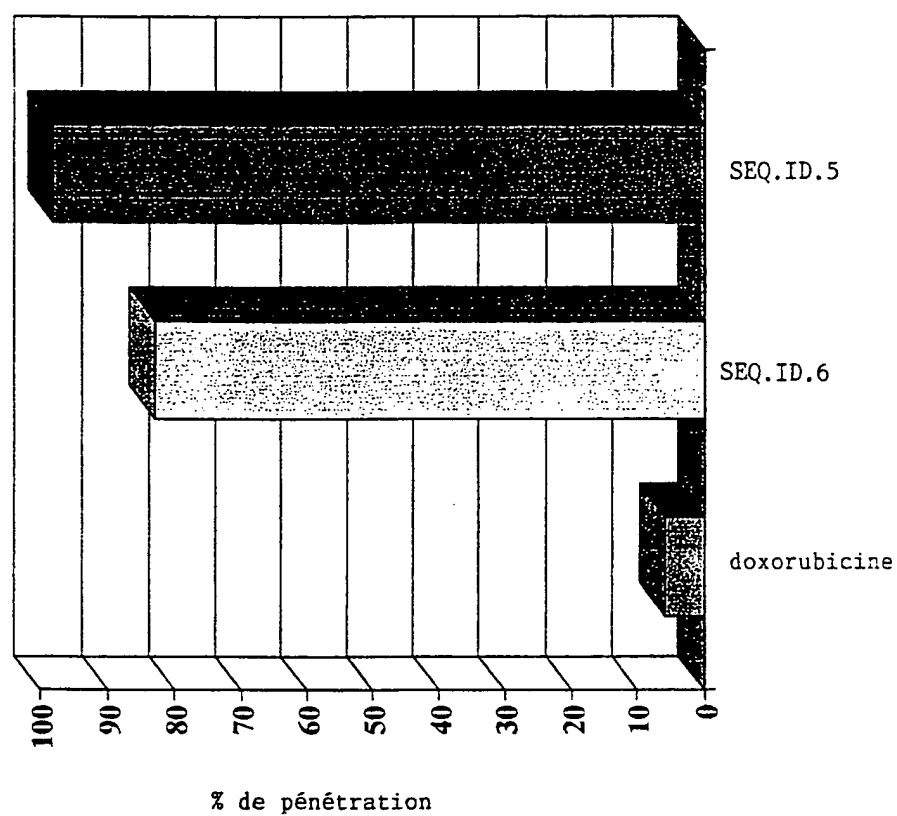
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Figure 2 : Préparation de doxorubicine-SMP-3MP-peptides



3/5

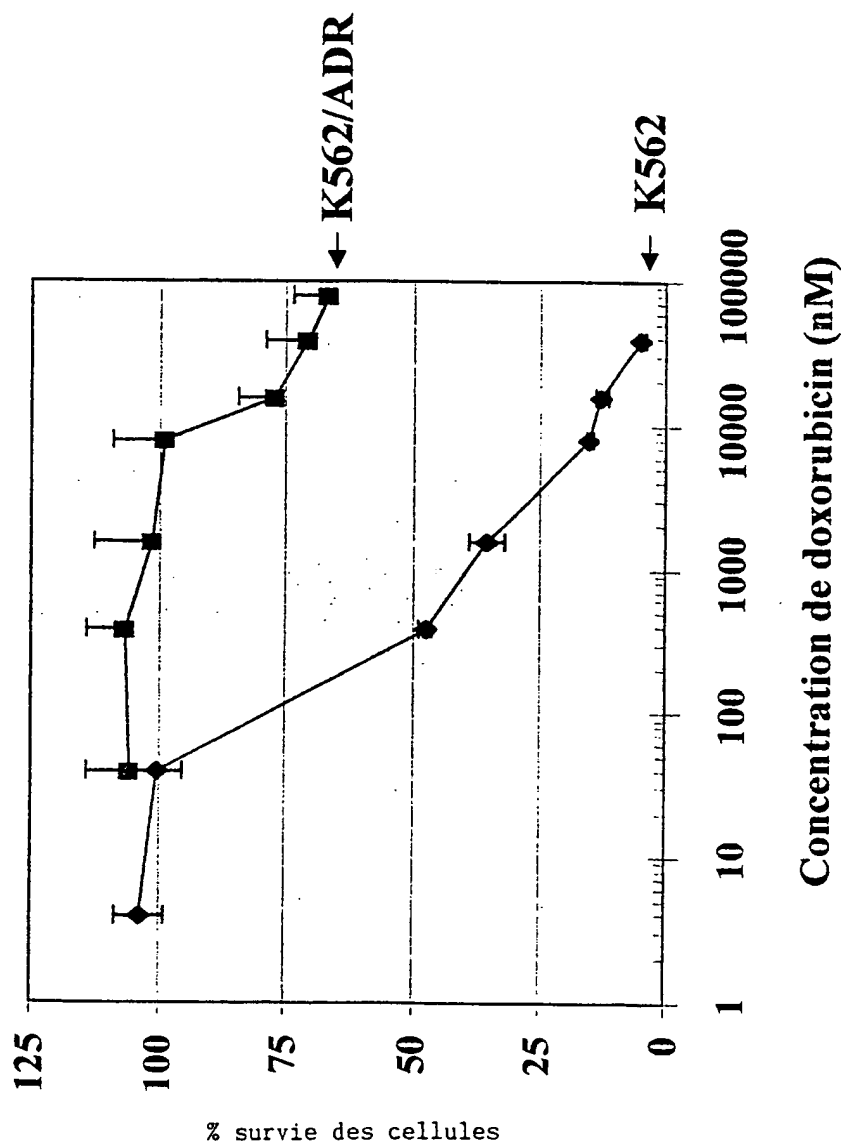
Fig.3



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

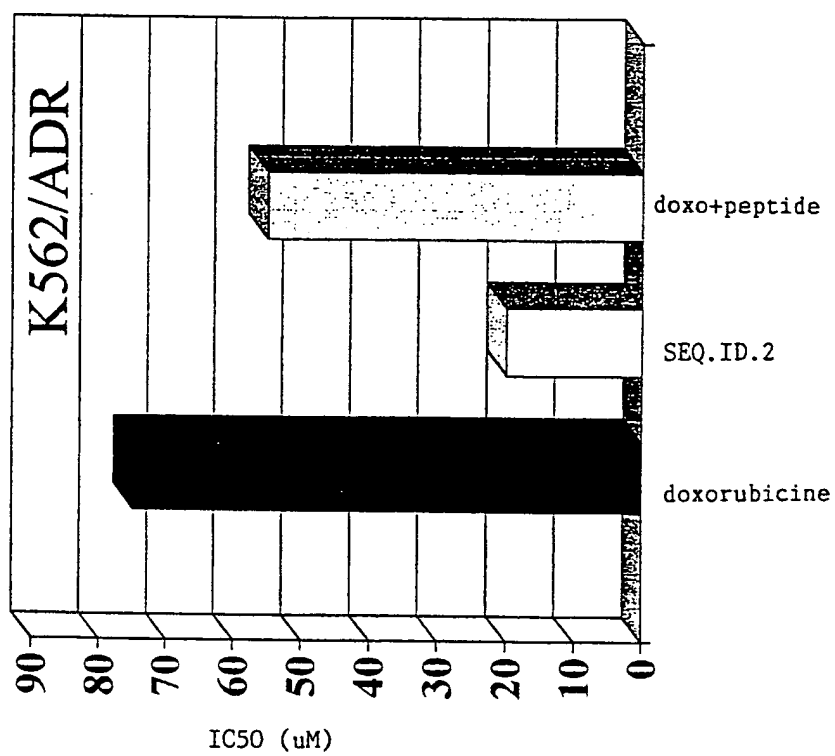
4/5

Fig.4



5/5

Fig.5



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02939

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 99 07728 A (CALAS BERNARD ;GRASSY GERARD (FR); SYNT EM S A (FR); CHAVANIEU ALA) 18 February 1999 (1999-02-18) cited in the application page 18, line 7 - line 21; claims	1-6
X	WO 97 12912 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;CHASSAING GERARD (FR); PROCHIANTZ ALAIN (F) 10 April 1997 (1997-04-10) cited in the application	1-6
Y	page 2, line 23 - line 26 page 3, line 24 -page 4, line 16; claims 1,6; table I	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 March 2000

Date of mailing of the international search report

20/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02939

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DEROSSI D. ET AL: "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 269, no. 14, 1994, pages 10444-10450, XP002114618 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 cited in the application figure 2	1-6
A	WO 97 19954 A (ASTA MEDICA AG) 5 June 1997 (1997-06-05) claims	
Y	WO 98 46250 A (PIETRAS RICHARD J ;UNIV CALIFORNIA (US)) 22 October 1998 (1998-10-22) page 156, sequences 34 and 35 claims 1,49	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02939

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9907728 A	18-02-1999	FR 2767323 A AU 8988998 A	19-02-1999 01-03-1999
WO 9712912 A	10-04-1997	FR 2739621 A EP 0797589 A JP 10510557 T	11-04-1997 01-10-1997 13-10-1998
WO 9719954 A	05-06-1997	US 5843903 A AU 709539 B AU 7572296 A BR 9611647 A CA 2238574 A CN 1202903 A CZ 9801357 A EP 0863917 A NO 982252 A NZ 322054 A PL 326865 A SK 62898 A	01-12-1998 02-09-1999 19-06-1997 23-02-1999 05-06-1997 23-12-1998 14-10-1998 16-09-1998 15-05-1998 29-04-1999 26-10-1998 11-06-1999
WO 9846250 A	22-10-1998	AU 7127398 A	11-11-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

Den a Internationale No
PCT/FR 99/02939

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K47/48		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
E	WO 99 07728 A (CALAS BERNARD ; GRASSY GERARD (FR); SYNT EM S A (FR); CHAVANIEU ALA) 18 février 1999 (1999-02-18) cité dans la demande page 18, ligne 7 - ligne 21; revendications	1-6
X	WO 97 12912 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ; CHASSAING GERARD (FR); PROCHIAINTZ ALAIN (F) 10 avril 1997 (1997-04-10) cité dans la demande page 2, ligne 23 - ligne 26 page 3, ligne 24 - page 4, ligne 16; revendications 1,6; tableau I	1-6
Y		1-6
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
13 mars 2000	20/03/2000	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010	Berte, M	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den a Internationale No
PCT/FR 99/02939

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DEROSSI D. ET AL: "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 269, no. 14, 1994, pages 10444-10450, XP002114618 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 cité dans la demande figure 2	1-6
A	WO 97 19954 A (ASTA MEDICA AG) 5 juin 1997 (1997-06-05) revendications	
Y	WO 98 46250 A (PIETRAS RICHARD J ;UNIV CALIFORNIA (US)) 22 octobre 1998 (1998-10-22) *page 156, séquences 34 et 35* revendications 1,49	1-6

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den
e internationale No
PCT/FR 99/02939

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9907728 A	18-02-1999	FR 2767323 A AU 8988998 A	19-02-1999 01-03-1999
WO 9712912 A	10-04-1997	FR 2739621 A EP 0797589 A JP 10510557 T	11-04-1997 01-10-1997 13-10-1998
WO 9719954 A	05-06-1997	US 5843903 A AU 709539 B AU 7572296 A BR 9611647 A CA 2238574 A CN 1202903 A CZ 9801357 A EP 0863917 A NO 982252 A NZ 322054 A PL 326865 A SK 62898 A	01-12-1998 02-09-1999 19-06-1997 23-02-1999 05-06-1997 23-12-1998 14-10-1998 16-09-1998 15-05-1998 29-04-1999 26-10-1998 11-06-1999
WO 9846250 A	22-10-1998	AU 7127398 A	11-11-1998

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)